



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Evaluación de una prueba rápida para monitorear la contaminación
por *Escherichia coli* en canales calientes y en carne procesada de
ovino”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

ELENA MORENO VALDÉS

ASESORES:

DR. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNEZ
DR. HUMBERTO GUSTAVO MONROY SALAZAR
M en C. POMPOSO FERNÁNDEZ ROSAS.

REVISORES.

Dr. VALENTE VELAZQUEZ ORDOÑEZ

Dr. MARTIN TALAVERA ROJAS

Toluca, México Mayo de 2018



Agradecimientos

A Dios por haberme dado la bendición de vivir, de tener personas maravillosas a mi lado, y la oportunidad de concluir con éxito esta meta y las que me he propuesto hasta el momento

A mi mamá por ser mi fortaleza, mi guía y mi apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, porque me impulsa para perseguir mis sueños y seguir adelante. Gracias por la paciencia y perseverancia y sobre todo por ser la persona que estará conmigo a pesar de todo. Gracias por ser mi mayor motivación.

A mi papá, quien dedicó su vida a amarme y dejarme tantas enseñanzas, quien con su sabiduría, y amor logró que me convirtiera en la persona que ahora soy; y que aún en la distancia sigue presente en mi mente y en mi corazón.

A mi hermana, que me ha brindado siempre su protección y cuidado, por amarme a su manera y por inspirarme a seguir adelante, por confiar en mí y en todo lo que hago y permanecer a mi lado en los buenos y malos momentos.

A Etni por su amor, por ser una persona maravillosa y especial en mi vida, por permitirme aprender cosas nuevas a su lado.

A Jorge Antonio Varela Guerrero por su gran apoyo en el trabajo de investigación, por ser una persona muy dedicada, paciente y dispuesta.

Al proyecto de investigación “Evaluación de la calidad de la carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano”. Registro 4038/2016A, y por la beca que otorgo la SIyEA UAEM.

Dedicatorias

Le dedico el presente trabajo y esfuerzo a todas aquellas personas que amo y que me aman, que siempre han creído en mí y que me han apoyado para la realización de éste, que es apenas el primer paso de mi desarrollo profesional y personal.

Fuente de financiamiento

El presente trabajo de tesis, se realizó con el apoyo del proyecto de investigación “Evaluación de la calidad de la carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano”. Registro 4038/2016A, Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México; otorgado al Cuerpo Académico Epidemiología y Salud Pública Veterinaria.

Título

“Evaluación de una prueba rápida para monitorear la contaminación por *Escherichia coli* en canales calientes y en carne procesada de ovino”

Resumen

Evaluación de una prueba rápida para monitorear la contaminación por *Escherichia coli* en canales calientes y en carne procesada de ovino

Moreno V.E.; Montes de Oca J.R.; Monroy S.H.G.; Fernández R. P.

La calidad higiénica de la carne es un tema trascendente para la salud pública, ya que el consumo de carne no inocua, es causa de una amplia gama de enfermedades que afectan al hombre, dentro de las cuales podemos encontrar a *Escherichia coli* la cual es una de las Enterobacterias más estudiadas en salud pública; debido a su alto potencial de causar enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's), esto generalmente ocurre por malas prácticas higiénico-sanitarias tanto en proceso de sacrificio como en la comercialización de los productos. Para evaluar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos se han creado diferentes técnicas y sistemas, siendo necesaria la implementación de métodos rápidos y confiables para el diagnóstico de bacterias relacionadas con las ETA's. En el presente trabajo se realizó una comparación entre la eficiencia diagnóstica de un método utilizado recientemente (Sistema MicroSnap^{MT}), y el método tradicional de cultivo bacteriano. Se analizaron 99 muestras de canal caliente y 99 muestras de carne procesada (Barbacoa), todas se sometieron a la prueba del sistema MicroSnap^{MT} y al aislamiento bacteriológico tradicional. La prevalencia de *E.coli* encontrada fue de 86.87% para el caso de canales calientes y 38.38% para carne procesada, el índice de concordancia Kappa es pobre entre ambas técnicas por lo cual el sistema MicroSnap^{MT} no es tan confiable, en cuanto a la especificidad fue de 62.63% y sensibilidad fue de 63.95% para el caso de canales calientes y para el caso de carne procesada la sensibilidad fue de 17.86% y especificidad fue de 94.37% lo cual nos indica que el sistema tradicional identifica 3.47 veces más *E.coli* que el sistema MicroSnap^{MT}, por lo cual podemos inferir que el método convencional de identificación de *E. coli*

continúa siendo mejor que el sistema de identificación rápida MicroSnap^{MT}.
Palabras clave. *E. coli*, Detección, Sistemas Rápidos

Evaluation of a rapid test to monitor pollution *Escherichia coli* on carcasses and meat processed sheep.

Moreno V.E.; Montes de Oca J.R.; Monroy S.H.G.; Fernández R. P.

ABSTRACT

The hygienic quality of meat is a transcendent subject for the public health system, just because eating innocuous meat cause a wide range of diseases, that affect people. Talking about this, we can find diseases such as *Escherichia coli* that is one of the most studied Enterobacteria inside the public health system; due to its high potential to cause Foodborne Diseases (ETA's, acronym in Spanish) this generally occurs due to poor hygienic-sanitary practices during the sacrifice process and meanwhile during the commercialization of the products. Different techniques and systems have been created, to evaluate the presence of pathogenic microorganisms in food, this must require the implementation of fast and reliable methods for the diagnosis of bacteria related to Foodborne Diseases. For this research a comparison was made between the diagnostic efficiency of a recently used method (Micro Snap System), and the traditional method of bacterial culture. It had been evaluated 99 samples of a hot-channel and also for this process also 99 samples of processed meat (Barbecue) were evaluated. All the samples of meat were analyzed subjected them to the Fast Identification Micro Snap System test and to the traditional bacteriological isolation. The results of this process threw that the prevalence of *E. coli* was found in a 38.38% into the hot-channels in a 86.87%, the Kappa concordance index it's not enough between both techniques, so the Fast Identification Micro Snap System is not trustworthy, in terms of the specificity the result was of 62.63% and sensitivity was 63.95% for the case of hot-channels, also for process meat the result of the sensitivity was

17.86% and specificity was 94.37% , this indicates that the traditional system identifies 3.47 times more of E.coli bacteria than the Micro Snap system, this result make us infer that the conventional method of identification of E. coli continues been better than the fast identification Micro Snap System.

Keywords: E. coli, Detection, Fast Identification Systems

Índice

I.	Introducción	1
II.	Revisión de literatura	3
1.	<i>Escherichia coli</i> : Morfología y Características generales	3
2.	Clasificación	4
3.	Cuadro clínico	6
3.1.	Infección en humanos	6
3.2.	Infección en animales	7
4.	Patogénesis	7
4.1.	Lesiones macroscópicas	9
4.2.	Lesiones microscópicas	9
5.	Diagnóstico clínico	9
6.	Tratamiento	10
7.	Prevención y Control	11
8.	Epidemiología	12
8.1.	Reportes de casos de cepas patógenas de <i>E. coli</i> (STEC)	12
9.	Reservorio	13
10.	Medidas sanitarias para evitar la contaminación de la carne con microorganismos patógenos	14
10.1.	Unidades de Producción	14

10.2. Instalaciones y vehículos	15
10.3. Manejo en rastro	15
10.4. Establecimientos para venta de productos cárnicos	18
11. Métodos e Instrumentos para la Vigilancia de microorganismos de la carne	19
11.1. Cultivo bacteriológico	19
11.2. Otras técnicas	20
11.3. Biosensores y su aplicación en la industria alimentaria	20
III. Justificación	23
IV. Hipótesis	25
V. Objetivos	26
VI. Material y método	27
1. Diseño del estudio	27
2. Obtención de la muestra	27
2.1. Muestras de canales calientes de ovinos	27
2.2. Muestras de carne procesada (barbacoa).	28
3. Identificación de cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizando la técnica de biosensor	29
4. Interpretación de la lectura en el Biosensor	30

5. Método microbiológico cultivo bacteriano en placa	31
6. Análisis de datos	31
6.1. Estimación de la prevalencia	31
6.2. Evaluación diagnóstica del sistema MicroSnap ^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de <i>E. coli</i> en canales calientes y carne procesada de ovino	32
6.3. Rendimiento global del Sistema MicroSnap ^{MT} para detectar cepas de <i>E. coli</i> en canales calientes y carne procesada de ovino (Curva Roc)	33
6.4. Índice de Concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap ^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de <i>E. coli</i> en canales calientes y carne procesada de ovino	35
VII. Limite de espacio	37
VIII. Limite de tiempo	38
IX. Resultados	39
1. Prevalencia de canales y carne procesada de ovinos contaminadas con cepas de <i>E. coli</i> .	39
2. Evaluación diagnostica del sistema MicroSnap ^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de <i>E. coli</i> en canales calientes y carne procesada de ovino	40
2.1. Canales calientes	40

2.2. Carne procesada	41
3. Rendimiento global del Sistema MicroSnap ^{MT} para detectar cepas de <i>E. coli</i> en canales calientes y carne procesada de ovino (Curva Roc)	42
4. Índice de Concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap ^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de <i>E. coli</i> en canales calientes y carne procesada de ovino	44
X. Discusión	46
XI. Conclusiones	51
XII. Literatura citada	52

Índice de tablas

1. Equivalencias entre Unidades Relativas de Luz (URL) y Unidades Formadoras de Colonia (UFC)	29
2. Cálculo de indicadores para evaluar la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap ^{MT} frente al método estándar (NOM-092-SSA1-1994) para identificar y cuantificar cepas de <i>E. coli</i> (UFC) en canales y carne procesada de ovino	32
3. Tabla de contingencia 2x2 para evaluar el sistema MicroSnap ^{MT} frente a la técnica estándar (Cultivo en placa), según Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994)	34
4. Valoración del índice Kappa	36
5. Identificación de cepas de <i>E. coli</i> en muestras de canales calientes y carne procesada de ovino, comparando el sistema MicroSnap ^{MT} frente al método estándar “cultivo en Placa” (NOM-092-SSA1-1994).	39
6. Evaluación de la capacidad diagnostica del Sistema MicroSnap ^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de <i>E. Coli</i> en canales calientes de ovinos	40
7. Evaluación de la capacidad diagnostica del Sistema MicroSnap ^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de <i>E. Coli</i> en carne procesada de ovino	41
8. Punto de corte (Área bajo la curva e IC95%) entre la Se. y la Es. para el sistema MicroSnap ^{MT} frente al cultivo en placa, para detectar cepas de <i>E. coli</i> en canales calientes y carne procesada de ovino	43
9. Valor de concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap ^{MT} y el método estándar (Cultivo en placa) para identificar cepas de <i>E. coli</i> en muestra de canales calientes y carne procesada de ovino	44

I. INTRODUCCIÓN

A fines del Siglo XX, el sector agropecuario mexicano enfrentó una serie de cambios derivado de la apertura y entrada de México al Acuerdo General sobre Aranceles Aduaneros y Comercio (GATT, - siglas en inglés) en 1986; y la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) en 1993. Estos acuerdos impactaron en el comercio internacional de alimentos, favoreciendo oportunidades para los consumidores, adquirir una mayor cantidad de opciones de productos vegetales y de origen animal de mejor calidad, inocuo y accesible. La calidad y la inocuidad de los productos son los principales atributos que rigen la oferta y demanda de los productos para consumo humano a nivel mundial

La calidad higiénica de la carne es un tema trascendente para la salud pública, ya que el consumo de carne no inocua, es causa de una amplia gama de enfermedades que afectan al hombre (Momtaz, *et al.*, 2013).

Quizás *Escherichia coli* (*E.coli*), sea una de las bacterias ampliamente estudiada e involucrada en intoxicaciones alimenticias producidas por bacterias. *E. coli* se encuentra en el tubo digestivo de una gran variedad de animales domésticos y silvestres, así como el ser humano, y la eliminan junto con las heces; por esta razón, la mayoría de los animales se consideran los principales reservorios biológicos de la bacteria. Los rumiantes domésticos (bovinos y ovinos, principalmente) se han reportado como los más importantes reservorios de la bacteria y su asociación con problemas de salud pública (Beutin, *et al.*, 2007).

En México, diversos trabajos publicados reportan la presencia de cepas de *E. coli* en carne de rumiante (Gallegos, *et al.*, 2009; Narvaez, *et al.*, 2013). Sin embargo, los trabajos no especifican en qué momento se contamina la carne para consumo humano; puesto que no existe reportes del control microbiológico durante los procesos de transformación y comercialización de los alimentos cárnicos; específicamente de la carne de ovino comercializada en el país.

En las actividades de vigilancia epidemiológica se utiliza una amplia variedad de herramientas para evaluar la calidad sanitaria de la carne. Para la microbiología de

los alimentos cárnicos, existen diversas técnicas que identifican la presencia de patógenos contaminantes; sin embargo, no hay un instrumento capaz de satisfacer las necesidades en función de los costos y el tiempo requerido para agilizar el proceso, así como la capacidad y eficiencia diagnóstica oportuna

La Norma Oficial Mexicana (NOM-009-ZOO-1994), referente al proceso sanitario de la carne, aplica exclusivamente para los establecimientos de Tipo Inspección Federal (Rastros TIF) y se administran por medio de la SAGARPA.

En la última década se reporta el uso de biosensores para el monitoreo microbiológico en el campo de la inocuidad de los alimentos. Los biosensores son dispositivos analíticos que incorporan un elemento de reconocimiento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo receptor, tejido, célula) o biomimético (PIMs, aptámeros, PNAs) asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito (González *et al.*, 2005). El sistema MicroSnap^{MT} está conformado por un elemento enzimático (β -galactocidasa y β -glucoronidasa) y un substrato bioluminigénico que desarrolla un haz de luz como señal de salida, proporcional a la concentración de la enzima producida en la reacción (Meighan, 2014). Este sistema ofrece un panorama prometedor, superando a los métodos tradicionales, en cuanto a especificidad y sencillez en el área agroalimentaria; sin embargo, la técnica todavía se encuentra en fase de desarrollo y evaluación.

El objetivo del presente trabajo es estimar la eficiencia diagnóstica del Sistema MicroSnap^{MT}, como herramienta para la vigilancia epidemiológica de *E. coli* en canales calientes de ovinos sacrificados en un rastro municipal del Estado de México y en carne procesada comercializada en puntos de venta de la ciudad de Toluca, Estado de México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. *Escherichia coli*: Morfología y Características generales

E. coli es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo, móvil con flagelos peritricos; no esporulado y anaerobio facultativo. También se han descrito cepas no móviles sin flagelos (Stanchi, 2010). Se destaca la presencia de pilis o fimbrias y cápsula sólo en algunas cepas, los flagelos peritricos y la membrana externa (Stanchi, 2010); estructuras que definen la patogenicidad de las cepas. *E. coli* es una bacteria de crecimiento rápido y amplia distribución en el suelo, el agua, los vegetales y gran variedad de animales (Moreno, 2006).

E. coli es uno de los microorganismos más difundidos en la naturaleza y además un integrante principal de la flora intestinal normal de los animales y el hombre (Zhao, *et al.*, 2012), ya que coloniza el intestino pocas horas después del nacimiento (Rodríguez, 2002). Sin embargo, existen determinados serotipos de *E. coli* que han desarrollado la capacidad de adherirse a las células epiteliales del intestino (Gallego y Pérez, 1993) y causar una variedad de enfermedades en el tracto intestinal y otros tejidos en el hospedador (Xia, *et al.*, 2010), como infección urinaria, septicemia, meningitis, entre otros. (Olivet, 2008).

Los parámetros que regulan el desarrollo de las cepas de *E. coli* son: Temperatura entre 40-44°C, pH: 6 a 7 y actividad de agua de 0.99; además tienen la característica que son altamente susceptibles al proceso de pasteurización (Michanie, 2003).

E. coli es capaz de crecer en medios de cultivo selectivos, como agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de cloruro de sodio (NaCl), fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos; es catalasa positivo, oxidasa negativo, reductores de nitratos a nitritos; La bacteria es capaz de producir ácidos y gases a partir de la azúcares (glucosa, arabinosa, lactosa)

Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son inhibidos por cianuro de potasio (KCN) e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. No produce ácido sulfhídrico (H₂S), además es ureasa y fenilalanina negativo, pero es positiva al indol y decarboxilan la lisina (Olivet, 2008).

Escherichia coli se clasifica según sus propiedades bioquímicas y serológicas; identificándose distintas especies y serovariedades (Michanie, 2003). Además de esta clasificación, existen métodos moleculares como el PCR para la identificación de *E. coli* como los genes *Stx1*, *Stx2*, que son característicos de las *E. coli* productoras de toxina Shiga.

El procedimiento serológico se basa en las diferencias antigénicas derivadas de la aportación de estructuras de superficie (antígeno O, somáticos; antígenos H, flagelares; antígenos K, capsulares y los antígenos F, fimbriales, entre otros) (Michanie, 2003; Hernández, 2013).

2. Clasificación

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea en humanos se clasifican en seis grupos, en base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico según Xia, *et al.* (2010), estos son:

- a) *E. coli* Enteropatógena (EPEC),
- b) *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)
- c) *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* verotoxigénica/ *E. coli* productora de la Toxina Shiga (VTEC o STEC).
- d) *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC),
- e) *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y,
- f) *E. coli* de adherencia difusa (DAEC).

- a) ***E. coli* Enteropatógena (EPEC).** Las EPEC causan una lesión característica en el intestino, la cual implica la destrucción de las microvellosidades sin que exista otro indicio de invasión de los tejidos. El cuadro clínico que se produce por dichas cepas se manifiesta con diarrea aguda, (que puede ser leve o grave), con vómito, fiebre y mala absorción (Moreno, 2006).
- b) ***E. coli* Enterotoxigénica (ETEC).** Las cepas ETEC son la causa principal de diarrea infantil en países en desarrollo y diarrea del viajero en países desarrollados. Los microorganismos se fijan a la pared celular del intestino delgado proximal mediante sus factores de colonización que son las fimbrias. Además de los factores de colonización, la virulencia de las cepas ETEC depende la formación de toxinas mediadas por plásmidos (Moreno, 2006).
- c) ***E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)** Son organismos muy parecidos a *Shigella*, que se caracterizan por causar ulceración del intestino grueso, ya que atacan específicamente la mucosa del colon, invadiendo y multiplicándose en las células epiteliales (Moreno, 2006).
- d) ***E. coli* Enteroagregativa (EAEC).** Las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar la producción y secreción de moco en la mucosa y el epitelio intestinal. Su producción está relacionada con la colonización persistente del intestino y como consecuencia se provoca la diarrea (Rodríguez, 2002).
- e) ***E. coli* de Adherencia difusa (DAEC).** Esta cepa de *E. coli* solo ha sido estudiada *in vitro*, donde se muestra su capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias dentro del intestino; sin embargo, la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo* (Rodríguez, 2002).

- f) ***E. coli* Productora de la Toxina Shiga (STEC).** Entre las cepas de *E. coli* causantes de diarreas, STEC ha surgido recientemente como un importante patógeno zoonótico transmitido por alimentos (Momtaz, *et al.*, 2012), teniendo la facilidad de propagarse en el ambiente, en los animales y los seres humanos; y relativamente pocos microorganismos son necesarios para causar enfermedad (Beutin, *et al.*, 2007). Entre los serogrupos más patógenos se encuentran *E coli* O157, O26, O103, O111, O145, O45, O91, O113, O121 (Magwedere, *et al.*, 2013); especialmente las del serotipo O157:H7 (Witold, *et al.*, 2011).

Las cepas STEC son altamente resistentes al estrés físico-químico, como la sequedad y la acidez gástrica (Michanie, 2003). Además, pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo en el suelo, el estiércol y el agua. La capacidad infecciosa de las cepas STEC en seres humanos, ha sido difícil de evaluar y es probablemente subestimada (Magwedere, *et al.*, 2013).

3. Cuadro Clínico

3.1. Infección en humanos

La enfermedad puede presentarse a partir de los días 1 a 8 del ingreso de la bacteria al organismo (Michanie, 2003), siendo el periodo de incubación entre los 3 y 4 días; y llega a ser leve o severa de acuerdo con la evolución de los signos (Hannaoui, *et al.*, 2009).

Clínicamente, la infección cursa en algunas ocasiones con grandes pérdidas de agua y electrolitos (Stanchi, 2010). Entre los síntomas clínicos más comunes se encuentran diarrea no sanguinolenta que puede evolucionar hasta tornarse sanguinolenta, dolores y espasmos abdominales, fiebres intermitentes, vómitos,

etc. (Hannaoui, *et al.*, 2009). Las cepas STEC pueden además causar daño endotelial vascular, Colitis Hemorrágica (HC), la cual puede progresar a Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Miko, *et al.*, 2009) que está compuesto por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal de aguda a severa (Etcheverría y Padola, 2013). En algunos casos llega a afectar también al sistema nervioso central, páncreas, pulmones y corazón (Roldán, *et al.*, 2007).

Los individuos más susceptibles de padecer infecciones y complicaciones por cepas patógenas de *E. coli* son los niños menores de 5 años y personas en la vejez, aunque en general los individuos de todas las edades pueden enfermarse. (Xia, *et al.*, 2010), (Page y Liles, 2014); presentándose una tasa de mortalidad del 3 al 5% de los casos con SUH (Michanie, 2003).

3.2. Infección en animales

Los neonatos y animales inmunodeprimidos son más susceptibles de adquirir la enfermedad que aquellos animales cuyas madres en algún momento estuvieron expuestas a cepas patógenas de *E. coli* o que inmunológicamente se encuentran protegidos. La inmunodepresión de los individuos crea focos de multiplicación y diseminación del microorganismo y aumenta la prevalencia de la enfermedad (Stanchi, 2010).

Generalmente, los animales que han sido expuestos e infectados por cepas patógenas de *E. coli* no muestran signos de enfermedad, por lo que pueden ser incluidos en la producción de alimentos y como consecuencia, los productos de origen animal, como carne y leche, representan un riesgo de contaminación por *E. coli* (Beutin, *et al.*, 2007).

4. Patogénesis

Los microorganismos tienen la facilidad de adherirse a la superficie de las mucosas del organismo de los animales. Inmediatamente después del nacimiento,

las mucosas del tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital, que son barreras naturales, van siendo colonizadas por microorganismos no patógenos, mediante el aire inspirado, los alimentos ingeridos y las excreciones fecales, respectivamente; constituyendo la “microbiota normal”, impidiendo que microorganismos patógenos se adhieran a la mucosa. Sin embargo, cuando esas barreras son vencidas, la microbiota patógena va rebasando rápidamente las mucosas estériles y la microbiota normal. Para poder desarrollar la patogénesis en una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, se realizan distintas interacciones entre el microorganismo y el hospedador (Stanchi, 2010).

Entre los factores de virulencia de *E. coli*, se encuentran los accesorios de adhesión a la mucosa, como la proteína de adhesión producida por el gen HlyA y una serie de toxinas, como las toxinas like Toxic producidas por los genes *Stx1* y *Stx2*.

E. coli tiene la capacidad de adherirse a las microvellosidades del epitelio intestinal, esta capacidad está vinculada a su propiedad de expresar estructuras proteicas de adhesión (adhesinas) sobre las fimbrias (Stanchi, 2010). Las toxinas Shiga (*Stx1*, *Stx2* y variantes) son los principales factores de virulencia (en muestras de carne animal) (Etcheverría y Padola, 2013). Otros factores incluyen a la intimina, una proteína de membrana, responsable de la unión íntima a los enterocitos y del barrido de las microvellosidades de la mucosa intestinal; la enterohemolisina, capaz de causar daño celular (Momtaz, *et al.*, 2013; Xia, *et al.*, 2010).

Las enterotoxinas son producidas por ciertas cepas de *E. coli*, con un alto grado de correlación con la expresión de adhesinas. La enterotoxina LT (termolábil) es una proteína constituida por una molécula de la subunidad A y cinco moléculas de la subunidad B. Las enterotoxinas termoestables (ST) son proteínas muy pequeñas y actúan como malos inductores de respuesta inmune, (Stanchi, 2010).

Las toxinas Stx1 y Stx2 han sido asociados con diarrea no complicada y excreción asintomática (Beutin, *et al.*, 2007), así como con la alta virulencia de STEC y con colitis hemorrágica (HC) y Síndrome Urémico Hemolítico (HUS) (Bielaszewska, *et al.*, 2006).

Momtaz, *et al.*, (2013), refieren que las cepas STEC que contienen los genes de virulencia *Stx1*, *Stx2*, *eae* y *hly*, tienen una alta incidencia en carne de res y de cordero, lo que demuestra su alto potencial de causar infección a los humanos.

4.1. Lesiones macroscópicas

Entre las lesiones más características causadas por cepas patógenas de *E. coli* se encuentra la inflamación de la mucosa intestinal, en algunos casos con exudado fibrino-hemorrágico, además de hemorragias petequiales y equimóticas en la superficie serosa de ciego y colon proximal (Rivas, *et al.*, 2008).

4.2. Lesiones microscópicas

Una de las lesiones histopatológicas más frecuentes causadas por *E. coli*, es la adhesión bacteriana a las vellosidades intestinales (sobre todo en íleon). Otras lesiones microscópicas presentes en los tres segmentos intestinales son la necrosis de las células del ápex de las vellosidades, la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas y el infiltrado leucocitario en las vellosidades y la lámina propia. Todas estas alteraciones afectan seriamente los procesos normales de absorción y excreción de agua y electrolitos (Canal, *et al.*, 1999)

5. Diagnóstico clínico.

Los casos clínicos de enfermedad por *E. coli* en los humanos se puede diagnosticar mediante el cultivo bacteriológico de muestras fecales o de muestras de alimentos para determinar el origen de la infección. Sin embargo, la identificación del agente en muchas ocasiones es difícil debido principalmente a la semejanza entre *E. coli* comensal y *E. coli* patógena.

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de cepas patógenas de *E. coli* se aplican métodos tradicionales (*in vivo* e *in vitro*), en base a las características fenotípicas, (Fernández, *et al.*, 2010) cultivo bacteriano, pruebas bioquímicas, pruebas basadas en la resistencia antimicrobiana, y de biología molecular (Rodríguez, 2002).

6. Tratamiento

Una vez presente la enfermedad en el humano, se pretende limitar la severidad y/o duración de síntomas gastrointestinales; prevenir las complicaciones sistémicas que comprometan la vida del individuo, tales como el SUH; y prevenir la diseminación de la enfermedad a otras personas (Hannaoui, *et al.*, 2009).

Es importante mantener un estado de hidratación adecuado del paciente, en todo momento del curso de la enfermedad, para proporcionar nefroprotección, esto mediante terapia de fluidos de acuerdo con las necesidades del paciente (Keefe, *et al.*, 2013).

Ante una enfermedad causada por cepas de *E. coli*, se requiere instaurar tratamiento con antimicrobianos., comúnmente empleadas las quinolonas, betalactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos y tetraciclinas). Estudios recientes han demostrado que cuando se administran los antibióticos en los primeros 3 días del inicio de los síntomas, se reduce el porcentaje de pacientes que progresan de diarrea sanguinolenta a SUH (Hannaoui, *et al.*, 2009). Sin embargo, en las últimas décadas, algunas cepas de *E. coli* han creado resistencia a los antibióticos, razón por la cual existen severas complicaciones e infecciones más graves por periodos de tiempo prolongados (Zhao, *et al.*, 2012); esto representa un problema emergente en todo el mundo (Sunde, 2005), por lo que la identificación de los diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos, como la alteración del sitio diana, la destrucción enzimática del agente y alteraciones en

la permeabilidad (Mosquito, 2011) (se vuelven indispensables para la reducción de costos de tratamiento (Momtaz, *et al.*, 2013).

Durante el curso de la enfermedad pueden presentarse complicaciones severas, que pueden requerir cuidados intensivos, incluyendo diálisis, transfusión y/o infusión plaquetaria (Rovid, *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, donde el tratamiento no es suficiente, las enfermedades causadas por *E. coli*, además de deprimir el sistema inmune y aumentar la susceptibilidad a otras enfermedades, pueden conducir a la muerte (Miko, *et al.*, 2009).

7. Prevención y Control

Dentro de una unidad de producción, se ha demostrado que el uso de probióticos (principalmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) en el ganado para el control de patógenos transmitidos por alimentos es muy importante al producir metabolitos inhibidores de cepas patógenas de *E. coli* (Etcheverría y Padola, 2013).

Una de las principales amenazas a la salud humana por infecciones de origen alimentario se da durante y después del sacrificio de los animales, por lo que debe ser mantenida una mayor vigilancia de los procesos de transformación de la carne (Evans, *et al.*, 2011), para reducir la contaminación microbiana y disminuir el riesgo de contraer la enfermedad por *E. coli* (Fernández, 2010).

Durante muchos años, la industria ganadera y los investigadores se han centrado en la mejora de la seguridad de los productos cárnicos después del sacrificio (Etcheverría y Padola, 2013), mediante tratamientos antimicrobianos post sacrificio y la implementación de políticas HACCP en plantas de faena, con el fin de reducir significativamente la contaminación de la canal (Elder, *et al.*, 2001).

La eliminación de los microorganismos a través de la cocción de los alimentos, así como medidas higiénico-sanitarias del personal y los consumidores, es esencial

para la prevención primaria de las infecciones por *E. coli* patógenas (Page y Liles, 2014).

8. Epidemiología

E. coli es una bacteria ampliamente distribuida en el planeta, aun en climas extremos. No obstante, la situación geográfica, temperatura y humedad ambiental son factores que determinan su incidencia, siendo mayor en zonas húmedas y cálidas (Stanchi, 2010).

Debido a la facilidad de contaminación por las heces de animales enfermos, *E. coli* puede ser transmitida a los humanos a través de diferentes rutas, incluyendo agua, alimentos y objetos contaminados (Page y Liles, 2014), contacto de persona a persona y contacto de animales a personas (Xia, *et al.*, 2010; Hale, *et al.*, 2012; Magwedere *et al.*, 2013).

El consumo de carne ha sido identificado como un importante factor de riesgo en individuos de todas las edades de infectarse con cepas patógenas de *E. coli* (Beutin, *et al.*, 2007).

Un estudio realizado por Evans *et al.*, (2011) en Escocia, mostró que la prevalencia de cepas patógenas de *E. coli*, es mayor durante los meses de Julio y Septiembre, en ovejas adultas. Sin embargo, los ovinos son considerados como portadores asintomáticos de algunos serovares de *E. coli* patógenas al ser humano como la *E. coli* enterohemorrágica, por lo cual esta bacteria se puede presentar en cualquier época del año en que sean sacrificados los ovinos.

8.1. Reportes de casos de cepas patógenas de *E. coli* (STEC)

En los últimos años, *E. coli*, como causante de enfermedades transmitidas por los alimentos, ha sido uno de los microorganismos más estudiados debido a su alta prevalencia en todo el mundo; en especial el serotipo STEC, que se ha

asociado con grandes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos de origen animal (Jacob, *et al.*, 2014), al ser un adulterante de la carne (Magwedere, *et al.*, 2013).

Se ha estimado que las infecciones por cepas STEC (O157:H7), son responsables de al menos 20.000 casos de enfermedad y 250 muertes por año en Estados Unidos, lo cual representa con un costo financiero de entre 250 y 500 millones de dólares (Magwedere, *et al.*, 2013).

En estudios recientes, realizados en diversas partes del mundo, se reporta una incidencia de contaminación de la carne con cepas STEC del 29.7%. En países como USA India, Nueva Zelanda y Bélgica, se ha reportado una contaminación del 1.8 al 50% (Brooks, *et al.*, 2001; Khan, *et al.*, 2002; Piérard, *et al.*, 1997; Samadpour, *et al.*, 2002; Momtaz, *et al.*, 2013; Ojo, *et al.*, 2010).

9. Reservorio

Los productos alimenticios procedentes de animales de granja y animales silvestres, tienen la capacidad de producir infecciones por *E. coli* patógena en seres humanos, y generalmente están causadas por STEC (Magwedere, *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que los rumiantes y sus productos cárnicos son los principales reservorios de la enfermedad transmitida por cepas patógenas de *E. coli* (Jacob, *et al.*, 2014).

En algunas investigaciones previas, las cepas STEC han sido identificadas en la carne de vacuno, de ovino, cabra y camello (Miko, *et al.*, 2009); (Ojo, *et al.*, 2010), resultando ser la carne de ovino la más contaminada, mientras que la carne de camello ha sido la menos contaminada (Momtaz, *et al.*, 2013). Otros estudios

similares realizados en Egipto (Abdul, *et al.*, 1996), Italia (Franco, *et al.*, 2009), Australia (Phillips, *et al.*, 2006) y Alemania, comprueban una mayor incidencia de cepas STEC en carne de ovino, asociado con el contacto de estos animales con los humanos; lo que demuestra la importancia de esta especie como reservorio de cepas de *E. coli* causantes de enfermedad (Jacob, *et al.*, 2014).

10. Medidas sanitarias para evitar la contaminación de la carne con microorganismos patógenos

Las buenas prácticas pecuarias son procedimientos recomendados y aprobados que integran los principios de: seguridad y calidad de un alimento, producción eficiente, implementación práctica, redituabilidad y calidad ambiental; desde que el producto es producido, hasta que llega al consumidor.

De acuerdo con el Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en la Producción de Carne de Bovino en Confinamiento (SAGARPA, 2010), se establecen los siguientes puntos para lograr que los alimentos destinados a consumo humano, lleguen a su destino en buenas condiciones higiénico-sanitarias, y con ello se disminuya el riesgo de padecer enfermedades transmitidas por alimentos.

10.1. Unidades de Producción

Dentro de una unidad de producción, la contaminación por microorganismos patógenos existe en todas partes, por ejemplo, en los bebederos, comederos, mezcladoras de alimento, el almacén, entre otros; debido a que son fuentes fácilmente contaminadas por roedores y materia fecal, por lo que es sumamente necesario implementar acciones estrictas de limpieza y sanitización dentro de la unidad (SAGARPA, 2010).

Las buenas prácticas nutricionales son esenciales para que los animales se mantengan con una buena salud y aumente su producción. Es necesario proveer una cantidad adecuada de nutrientes para el crecimiento, mantenimiento corporal

y producción (ganancia diaria de peso). Se recomienda además suministrar agua potable de forma abundante, ya que es primordial para la producción y salud del ganado (SAGARPA, 2010).

Otras causas de contaminación microbiológica en el ganado son los residuos de alimento en los comederos, sobre todo si se encuentran en descomposición, y el agua sucia en los bebederos (SAGARPA, 2010).

Es necesario mejorar la calidad de las explotaciones ganaderas, con el objetivo de optimizar el manejo, control y transporte del ganado, y asegurar que el animal llegue en las mejores condiciones posibles al sacrificio (SAGARPA, 2010)

10.2. Instalaciones y vehículos

Las instalaciones deben ser diseñadas y construidas con el fin de evitar accidentes que dañen o lastimen a los animales; fabricados de un material no resbaladizo y anti-derrapante, y sin salientes filosas. Es importante que sean inspeccionadas regularmente (SAGARPA, 2010).

Los vehículos utilizados para el transporte de animales, deben ser adecuados para su uso, con el objetivo de reducir el estrés y evitar accidentes que puedan llegar a afectar la integridad física y salud de los animales, así como la calidad de los productos que se obtienen de ellos, como la carne (SAGARPA, 2010).

10.3. Manejo en Rastro

La NORMA Oficial Mexicana NOM-009-Z00-1994: Proceso sanitario de la carne, instaure las siguientes pautas para el manejo del animal desde que llega hasta que sale del rastro.

Se debe establecer un periodo de descanso previo al sacrificio de 12 a 24 horas en el caso de ovinos, que se ha de realizar en instalaciones adecuadas, y

proporcionarles suficiente agua limpia y fresca, para garantizar, entre otras cosas, que no se sacrifiquen animales con signos de estrés o cansancio. Durante esta fase se realiza la inspección ante mortem.

- Inspección Ante-mortem: Toda inspección y aprobación de los animales, tiene que realizarse por veterinarios autorizados. Es importante realizar un examen o reconocimiento de los animales vivos.
 - Los animales que se consideren sospechosos de padecer alguna enfermedad infectocontagiosa, deberán ser separados y si para cuyo diagnóstico es imprescindible la colaboración del laboratorio, se procederá a la toma y envío de muestras. Una vez recibida la respuesta del laboratorio, si el resultado confirma el diagnóstico presuntivo, los animales serán sacrificados al final y por separado de otros animales.
- Examen post-mortem: Una vez sacrificados los animales, las canales, órganos y tejidos, tienen que ser sometidos a un examen macroscópico; y en caso necesario ser complementado con un examen microscópico y/o bacteriológico. Las canales y vísceras han de lavarse con agua a presión
 - La evisceración debe ser efectuada en un lapso menor de 30 minutos, a partir del momento en que ha sido sacrificado el animal y se debe realizar ligadura en la porción terminal del colon y la faringe para evitar contaminación por contenidos del tubo digestivo.
 - Toda canal en la que se observe alguna lesión, será enviada al riel de retención para el examen.
 - Cuando se presenten enfermedades cuyo diagnóstico amerite pruebas de laboratorio, la canal y sus vísceras se depositarán en la cámara frigorífica, hasta que los exámenes de laboratorio permitan orientar el criterio a seguir.

- Las canales, vísceras y cabezas no aptas para el consumo humano, se enviarán al horno incinerador.
 - Posteriormente, de acuerdo con la NOM-009-Z00-1994, se realiza el marcado de las canales y productos aprobados para consumo humano, con tinta de color rojo; productos aprobados para cocción, tinta azul; y los productos decomisados, con tinta negra.
 - Debe efectuarse una correcta limpieza y desinfección de la maquinaria, equipo y el personal en contacto con las canales, vísceras y órganos de los animales durante la inspección.
-
- Transporte de productos de origen animal: El MVZ podrá expedir un certificado zoosanitario para la movilización de las canales, o sus productos comestibles, si éstos llevan los sellos de inspección.
Los vehículos utilizados para su transportación tendrán que estar en buen estado, limpios y acondicionados con refrigeración o congelación, materiales impermeables, el exterior pintado de colores claros y evitar que las canales y productos tengan contacto con el piso o paredes.
 - Personal: El personal que tiene contacto con la carne deberá justificar su estado de salud como aceptable, por medio de un certificado de salud expedido por un centro de salud competente. Así mismo, las personas que padezcan enfermedades infecto-contagiosas, no podrán ejercer contacto directo con productos comestibles en cualquier etapa de su proceso. El personal está obligado a vestir ropa de colores claros que cubran todas las partes de su cuerpo que puedan entrar en contacto con los productos alimenticios, así como cubrir la cabeza con cofia, usar calzado de hule, lavarse las manos, brazos y antebrazos con agua caliente y jabón, así como mantener sus uñas cortas. La ropa de trabajo deberá estar limpia y si se ha estado en contacto con partes de animales infectados con microorganismos patógenos, deberá ser cambiada y esterilizada.

10.4. Establecimientos para venta de productos cárnicos

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios; en un establecimiento de servicio de bebidas se deben llevar a cabo las siguientes medidas:

- Que el lugar disponga de un abastecimiento suficiente de agua potable y usarse para evitar la contaminación de las materias primas, alimentos o bebidas.
- La temperatura mínima interna de cocción de los alimentos cárnicos debe ser de al menos 68°C.
- Se debe procurar que los alimentos estén expuestos al ambiente el menor tiempo posible
- Cuando se utilicen vísceras para la preparación de alimentos, deben lavarse interna y externamente y conservarse en refrigeración o congelación.
- Debe realizarse la limpieza de equipo y utensilios, y los que estén en contacto directo con los alimentos y bebidas deberán desinfectarse.
- Si el personal que elabora alimentos o bebidas manipula dinero, debe utilizar guante o protección de plástico para evitar el contacto directo de las manos con el dinero
- Tanto los establecimientos fijos como los ambulantes deben cumplir con dicha norma.

En un estudio realizado por (Favila, 2010), menciona que entre los resultados observados en los mataderos, en el 37.8% no se realiza inspección *antemortem*, en el 55.1% el faenado se realiza a nivel de piso, en el 84.7% no se cuenta con esterilizadores de cuchillos, el 17.9% no

cuenta con agua potable; en el 83% no se cuenta con cámara de refrigeración, en el 27.7% no se identifican las vísceras del animal y en el 93% éstas no se refrigeran, además de que el 43.9% no cuenta con vestimenta de trabajo.

Aunque generalmente en menos proporción, los resultados también evidencian malas prácticas en rastros por mencionar algunas: en el 19% no se realiza inspección antemortem, en el 62.9% no se lleva a cabo el baño de los animales antes del sacrificio, sólo el 23% de los rastros emplean carros específicos para el transporte de las vísceras de la línea de matanza a la sala de revisión, en el 77.9% no se refrigeran las vísceras y en el 87.6% no hay planta de luz en funcionamiento (Favila, 2010).

Estas condiciones influyen de manera negativa en la calidad sanitaria de la carne.

11. Métodos e Instrumentos para la Vigilancia de microorganismos de la carne

Para poder identificar microorganismos patógenos en la carne, se utilizan diferentes técnicas. Desde hace mucho tiempo los métodos tradicionales incluyen el cultivo bacteriológico, mientras que en la actualidad se han creado otros métodos más específicos y rápidos para la identificación del agente, entre los cuales se encuentran los biosensores; sin embargo, éstos siguen en fase de evaluación (Palomino y González, 2014)

11.1. Cultivo bacteriológico

El cultivo bacteriológico es la prueba convencional indiscutible para confirmar la presencia de agentes patógenos contaminantes en los alimentos. Sin embargo, este proceso rebasa las 48 horas para el diagnóstico (Stanchi, 2010).

E. coli es un bacilo gram-negativo, móvil, que tiene reacciones catalasa positivo, oxidasa negativo, no forma H₂S, reduce nitrato y la mayoría de las cepas posee β -glucuronidasa y β -galactosidasa. Éstas producen unas colonias oscuras con brillo verde metálico sobre Agar Eosina - Azul de Metileno (EMB). Se suele usar agar McConkey, donde las colonias presentan color violeta. Sin embargo *E. coli* O157H7 no fermenta lactosa ni sorbitol, no posee β -glucuronidasa y no crece a 45°C (Stanchi, 2010).

Para la identificación se hacen tradicionalmente las pruebas que representan a la producción de indol, las reacciones del rojo de metilo y Voges-Proskauer y el crecimiento en un medio con citrato, mostrando *E. coli* el patrón “+ + – –”, respectivamente (Stanchi, 2010).

11.2. Otras técnicas

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico de *E. coli*, que tienen la capacidad de detectar concentraciones muy bajas de cepas patógenas en pocas horas; algunos de ellos son: identificación del ácido nucleico, los dispositivos de microfluidos, métodos de amplificación de la señal, inmunoensayos y biosensores (Alonso y Poveda, 2008).

11.3. Biosensores y su aplicación en la industria alimentaria

El interés dentro del campo agroalimentario se centra principalmente en el análisis de la composición de los alimentos, en la seguridad alimentaria y en el control de procesos. Esto crea la necesidad de desarrollar e implantar sistemas de control encaminados a aumentar la seguridad y la calidad de los alimentos. En cuyos casos se define la prioridad de desarrollar métodos moleculares de detección, análisis y diagnóstico que sean rápidos, de alta sensibilidad y que permitan rastreos automatizados para un amplio espectro de agentes que amenazan la inocuidad de los alimentos. (González, *et al.*, 2005).

Los biosensores son dispositivos analíticos conformados por un elemento biológico de reconocimiento asociado a un mecanismo de detección e interpretación de la señal obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico, constituyéndose en una herramienta para inspeccionar la calidad y los procesos con un panorama prometedor con respecto a los métodos tradicionales, en cuanto a especificidad, sencillez, respuesta clara y real en las áreas ambiental, clínica y de alimentos (Jiménez y León, 2009). Se denomina “biosensor” a la unión entre un material biológico y un transductor físico.

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, calor, cambio de potencial, cambio de masa, variación de propiedades ópticas, entre otros), que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio (González, *et al.*, 2005).

Los biosensores utilizados para el análisis directo de microorganismos patógenos en alimentos son de tipo inmunológico con transductores ópticos, piezoeléctricos, impedancia o bioluminiscentes (Jiménez y León, 2009; González, *et al.*, 2005). Los biosensores permiten tomar la decisión en el momento oportuno, trazando y monitoreando procesos.

Las características deseables de los biosensores, según González, *et al.*, (2005), son las siguientes: alta selectividad, alta sensibilidad, alta fiabilidad, tiempo de vida largo, tiempo de análisis corto, bajo costo, manejo sencillo, análisis en tiempo real, portátil y automatizable.

El sistema MicroSnap^{MT} está conformado por un elemento enzimático (β -galactocidasa y β -glucoronidasa) y un substrato bioluminigénico que desarrolla un

haz de luz como señal de salida, proporcional a la concentración de la enzima producida en la reacción. La técnica utiliza dos fases para determinar la concentración enzimática, la primera fase se trata del enriquecimiento de la muestra en un caldo de cultivo específico con una incubación de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; después de 6 u 8 h, una alícuota es tomada del medio enriquecido y vertido en el dispositivo de detección de *E. coli*, la cual es detectada en un luminómetro, después de 10 min de incubación a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Las Unidades Relativas de luz resultantes en el dispositivo de detección son proporcionales a la concentración bacteriana (Meighan, 2014).

A pesar de la cantidad de referencias de aplicaciones de biosensores a la industria de alimentos y bebidas la mayor parte de ellos aún se encuentra en fase de investigación y son muy pocos los productos que están siendo comercializados, debido principalmente a limitaciones técnicas como mejora de la selectividad o la sensibilidad del sensor, tiempo de respuesta o la capacidad de regeneración de la superficie de interacción; así como el desconocimiento de la tecnología y sus bondades (Jiménez y León., 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), representantes de la Secretaría de Salud y de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), respectivamente; realizan actividades compartidas para cubrir las diferentes etapas del Sistema de Certificación de los productos nacionales para su consumo o bien para los productos que se importan o exportan. Estos servicios hacen uso de métodos e instrumentos para garantizar la calidad e inocuidad del producto final; en especial para atestiguar la calidad e inocuidad de los alimentos.

En referencia a la contaminación microbiológica de los alimentos, *Escherichia coli* es una enterobacteria del hombre y la mayoría de los mamíferos. Algunas cepas de *E. coli* no patógenas pueden ser portadoras de elementos genéticos que codifican factores de virulencia, y afectan a individuos, principalmente inmunodeprimidos. Por otra parte, las cepas patógenas de *E. coli*, son capaces de colonizar deferentes tejidos de un huésped sano, y producir diversas infecciones en el intestino, en las vías urinarias, en el cerebro, entre otros órganos y sistemas.

Los animales enfermos o sanos, portadores de *E. coli*, eliminan la bacteria por las heces, y estas, contaminan el ambiente, incluyendo el agua de bebida y los alimentos para consumo humano. La presencia de *E. coli* en el agua o los alimentos es un indicador del grado de contaminación y en consecuencia del nivel higiénico-sanitario que se ejerce durante los procesos de producción, transformación y comercialización de los animales domésticos y sus productos para consumo humano; por lo que *E. coli* se considera una de las bacterias más importantes en salud pública.

En México, los servicios de salud a través de la Dirección General de Epidemiológica, cada año registra un número importante de toxiinfecciones alimentarias asociadas a distintos agentes patógenos entre las que se encuentran diferentes cepas de *E. coli*. Las autoridades sanitarias están obligadas a mantener estrictas medidas de vigilancia epidemiológica durante las etapas de la cadena de producción, transformación, distribución y consumo de alimentos. Lo anterior obliga a tener métodos rápidos, sensibles y específicos, para detectar la presencia de agentes microbiológicos contaminantes en los alimentos, en especial en los productos cárnicos.

Los métodos sensibles y específicos, rápidos y económicos son la mejor herramienta para la vigilancia epidemiológica en el campo de la inocuidad alimentaria. Los biosensores, como el sistema MicroSnap^{MT} ofrecen un panorama prometedor, superando a los métodos tradicionales, en cuanto a especificidad y sencillez en el área agroalimentaria. Sin embargo, la técnica todavía se encuentra en fase de desarrollo y evaluación. Por lo anterior el propósito del trabajo es evaluar la eficiencia diagnóstica de la técnica MicroSnap^{MT}, como herramienta para la vigilancia epidemiológica de *E. coli* en canales calientes de ovinos sacrificados en un rastro municipal del Estado de México y en carne procesada comercializada en puntos de venta de la ciudad de Toluca, Estado de México.

IV. HIPÓTESIS

El sistema MicroSnap™ identifica la presencia de *Escherichia coli* en canales calientes y carne procesada de ovino con la misma eficiencia que el método de aislamiento bacteriológico tradicional.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estimar la eficiencia diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} como herramienta para identificar y cuantificar cepas de *E. coli* durante el proceso de inspección higiénico-sanitario en los establecimientos para matanza y puntos de venta de productos cárnicos de ovinos.

2. Objetivos específicos

- a. Estimar la prevalencia de muestras contaminadas con cepas de *E. coli* en canales calientes y en carne procesada (Barbacoa) de ovinos.
- b. Realizar la evaluación diagnóstica del Sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar (Cultivo en placa) para identificar cepas de *E. coli* en canales calientes y en carne procesada (Barbacoa) de ovinos.
- c. Estimar el rendimiento global del Sistema MicroSnap^{MT} para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino
- d. Estimar el Índice de Concordancia entre el Sistema MicroSnap^{MT} y el Método Estándar para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

1. Diseño de estudio.

Para probar el valor diagnóstico del sistema MicroSnap^{MT} (Método Bioluminógeno) como herramienta diagnóstica para emplearse en los procesos de monitoreo higiénico-sanitario de los productos cárnicos en establecimientos de sacrificio y puntos de venta de carne de ovino; se llevó a cabo tomando muestras biológicas (Hisopados) a partir de canales calientes de ovinos sacrificados en el Rastro Municipal de Capulhuac, Estado de México, y en muestras de carne procesada (Barbacoa) expendidas en diferentes puntos de venta en la periferia de la Ciudad de Toluca, México.

2. Obtención de las muestras Biológica.

2.1. Muestras de canales calientes de ovinos.

Se tomaron al azar 99 muestras de canal caliente (ovinos recién faenados en rastro). El procedimiento se realizó según indicaciones del fabricante (Hygiena, número de catálogo 064547) del sistema MicroSnap^{MT}. El área anatómica donde se obtuvo la muestra corresponde al flanco derecho de la canal (Figura 1).

El hisopo fue frotado en forma de zig-zag en un área aproximada de 20 cm² (Figura 2a y 2b). Inmediatamente el hisopo impregnado con la muestra se introduce a un tubo de enriquecimiento y se guarda para su transporte bajo temperatura de refrigeración.

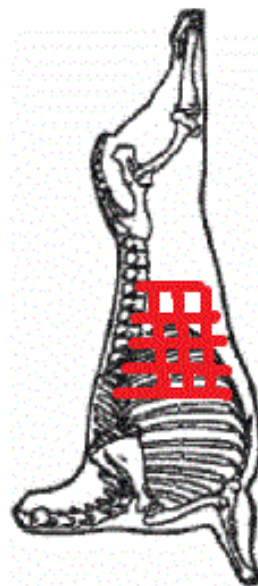


Figura 1. Área anatómica de la canal de ovino (líneas rojas) para obtener la muestra biológica con el hisopo. (Fuente. Tomado de: <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/principais-cortes-comerciais-da-carcaca-ovina-40929n.aspx>).

2.2. Muestras de carne procesada (barbacoa).

Las muestras de carne procesada de ovino (Barbacoa) se obtuvieron a partir de 99 establecimientos diferentes. La recolección de la muestra se realizó en un horario entre las 9 y 10 de la mañana de los días domingos, durante octubre del 2015 a enero del 2016. La cantidad de muestra recolectada fue aproximadamente 50g. La muestra se guardó bajo condiciones de refrigeración para transportarse al laboratorio del Centro de Investigación y Estudios avanzados en Salud Animal. FMVZ UAEM.

3. Identificación de cepas de *Escherichia coli* utilizando la técnica de biosensor

En el laboratorio, se continuaron con los pasos establecidos por el fabricante para la identificación y conteo de *E. coli* (Figura 2. Pasos de 1 al 3).

Paso 1. Enriquecimiento. En la imagen **c** se muestra la introducción y agitación del hisopo al tubo con medio de enriquecimiento específicos para *E. coli*. Este procedimiento tarda 8 horas en incubación a 37°C (imagen **d**).

Paso 2. Detección. En las imágenes **e, f y g**, se muestra el procedimiento para la detección de *E. coli*. Después del periodo de incubación se vierte la muestra en un tubo con medios específicos para detectar *E. coli*. La muestra se incuba nuevamente por un lapso de 10 minutos.

Paso 3. Lectura. La imagen **h**, muestra el procedimiento para hacer la lectura utilizando el biosensor. El hisopo es introducido al luminómetro y si hay presencia de *E. coli*, el luminómetro emite una lectura expresada en Unidades Relativas de Luz (URL), cuyas equivalencias se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Equivalencias entre Unidades Relativas de Luz (URL) y Unidades Formadoras de Colonias (UFC/gr)

Luminómetro (URL)	Equivalencia de UFC/gr
<2	<10
2 < 4	10 < 20
4 < 7	<50
7 < 12	<100
12 < 20	<200
20 < 35	<500
35 < 60	<1,000
60 < 180	<5,000
180 < 300	<10,000

Fuente: Modificado de: <http://www.higiene.com/microsnap-e-coli-food-and-beverage.html>

Se realizó la lectura de ellos con el luminómetro (biosensor), que es un sistema rápido de monitoreo de microorganismos patógenos usado en la industria alimentaria. Los resultados fueron capturados en un software *Sure Trend* versión 3.01.

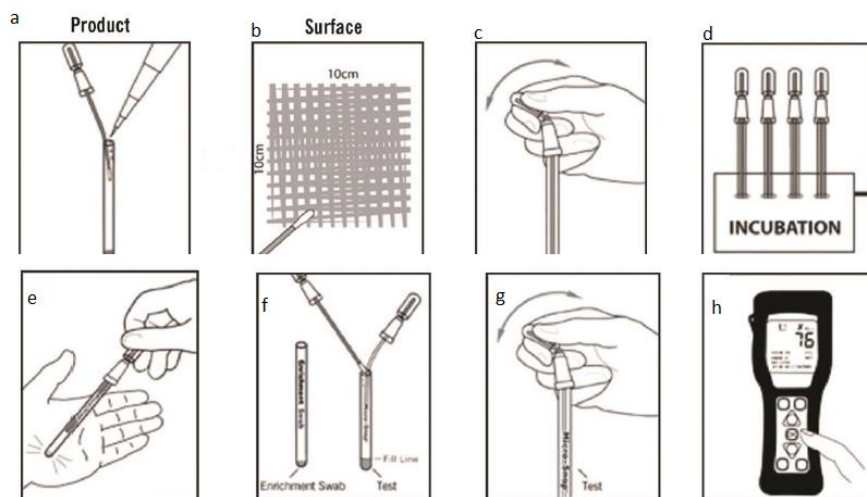


Figura 2. Procedimiento para la toma de muestra biológica, enriquecimiento, detección y conteo de Cepas de *E. coli* por medio de la técnica de Luminiscencia (MicroSnap^{MT}).

Fuente: <http://www.hygiena.com/microsnap-e-coli-food-and-beverage.html>

4. Interpretación de la lectura en el Biosensor

La lectura de URL fue interpretada según el tipo de Muestra:

- a) La muestra para canal se consideró positiva a *Escherichia coli* cuando la lectura reveló resultados >12 URL (Unidades Relativas de Luz).
- b) La muestra de barbacoa se consideró positiva a *Escherichia coli* cuando la lectura reveló resultados > 2 URL.

5. Método microbiológico cultivo bacteriano en placa.

A partir de los resultados obtenidos con el luminómetro se aplicó el método convencional de cultivo bacteriano en placa para identificar y la presencia de *E. coli* utilizando un control positivo (Magwedere, *et al.*, 2013).

Se utilizó como medio de cultivo Agar MacConkey (Xia, *et al.*, 2010; Momtaz, *et al.*, 2010; Evans, *et al.*, 2011), y Agar Eosina y Azul de Metileno (Stanchi, 2010), y se sometieron a incubación por 24 horas a 37°C, siguiendo los procedimientos de rutina (Evans, *et al.*, 2011).

Después de la purificación de la colonia se realizaron pruebas bioquímicas de TSI, MIO, SIM y Urea, como pruebas básicas para identificar colonias sugestivas a *E. coli* (Momtaz, *et al.*, 2013; Beutin, *et al.*, 2007) y se complementó con la prueba rápida de oxidasa y catalasa (Xia, *et al.*, 2010) y la tinción de Gram, para confirmar los resultados.

Las muestras positivas de *E. coli*, se conservaron y almacenaron en criotubos agregando medios de enriquecimiento (Caldo BHI- Infusión Cerebro Corazón), con 15-20% de glicerol.

6. Análisis de datos.

6.1 Estimación de la prevalencia.

La Estimación de la Prevalencia de muestras contaminadas con cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino, se utilizó como criterio los resultados del método estándar o prueba de oro (Cultivo en placa), según el método descrito en la NOM-092-SSA1-1994, para identificar y cuantificar la cantidad de cepas de *E. coli*. A la prevalencia se obtuvo su intervalo de confianza al 95%.

6.2 Evaluación diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino

- Prevalencia de muestras contaminadas con *E. coli* (%)
- Muestras correctamente diagnosticadas (%)
- Sensibilidad (%)
- Especificidad (%)
- Valor predictivo positivo (%)
- Valor predictivo negativo (%)
- Cociente de probabilidades positivo
- Cociente de probabilidades negativo

Tabla 2. Cálculo de indicadores para evaluar la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar (NOM-092-SSA1-1994) para identificar y cuantificar cepas de *E. coli* (UFC) en canales y carne procesada de ovino.

Indicador	Ecuación
Prevalencia	$\frac{C}{N}$
	Donde: c= muestras positivas n=total de muestras
Sensibilidad	Se = $\frac{a}{a+c}$
	a= Verdaderos Positivos c= Falsos Negativos
Especificidad	Es = $\frac{d}{b+d}$
	b= Falsos Positivos d= Verdaderos Negativos
Valor Predictivo de los positivos	VPp = $\frac{a}{a+b}$

Valor predictivo de los negativos	$VPn = \frac{d}{c+d}$
Cociente de probabilidades positivo	$CP+= \frac{Sen}{1-Esp}$
Cociente de probabilidades negativo	$CP-= \frac{1-Esp}{Sen}$

6.3. Rendimiento global del Sistema MicroSnap^{MT} para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino (Curva Roc).

Para estimar el rendimiento global del sistema MicroSnap^{MT}, se utilizó a técnica de la Curva ROC. Este análisis calcular el punto de corte en escala continua que determina la sensibilidad y especificidad más alta que se alcanza por el sistema MicroSnap^{MT}, y que corresponde al área bajo la curva en función del punto de corte como se ejemplifica en la figura 3 (Cerde y Cifuentes, 2012).

El procedimiento se inicia obteniendo la prevalencia (proporción de muestras positivas a *E. coli*), la sensibilidad (Se), la especificidad (Es), el valor predictivo de los positivos (VPp) y el valor predictivo de los negativos (VPn) por el sistema MicroSnap^{MT}(procedimiento a comprobar), auxiliándose de la tabla de contingencia 2x2 (Tabla 1 y 2).

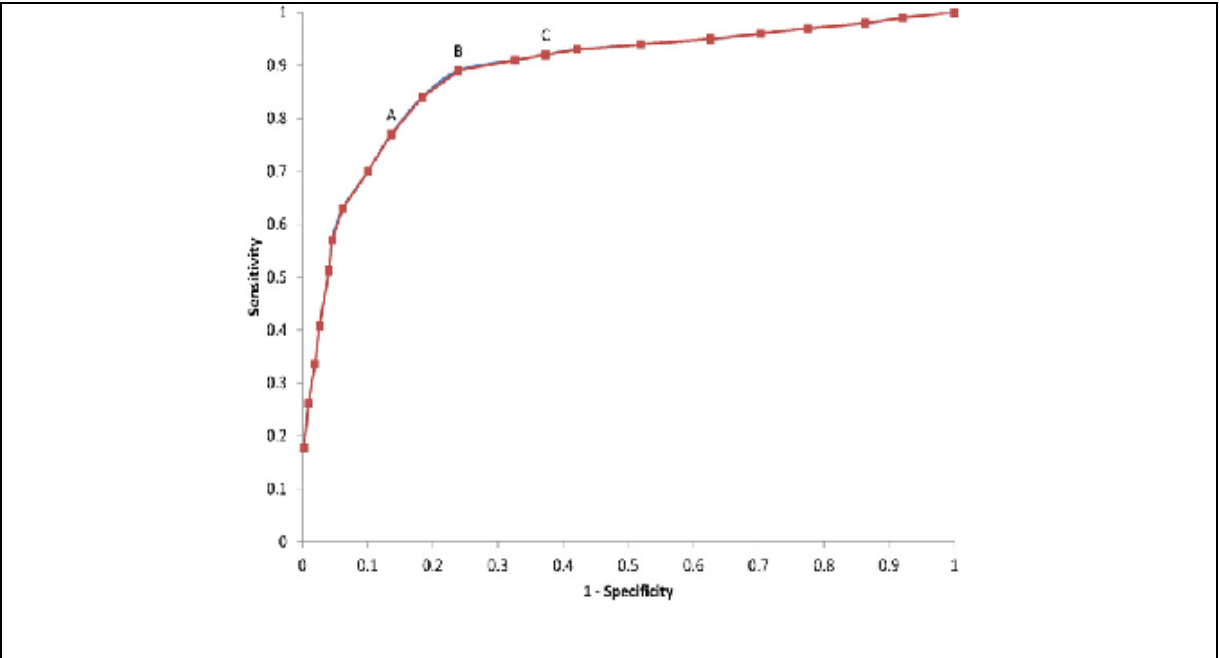


Figura 3. Ejemplo de una Curva ROC, en base al cálculo del punto de corte entre la Sensibilidad y Especificidad más alta de una prueba diagnóstica.

Fuente. Tomado de Althouse DA (2016). Literales A, B, C, muestran distintos Índices de Youden, que corresponde al valor del área bajo la curva en base a la sensibilidad y especificidad).

Tabla 3. Tabla de contingencia 2x2 para evaluar el sistema MicroSnap^{MT} frente a la técnica estándar (Cultivo en Placa), según Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994).

		Prueba Estándar	
		+	-
MicroSnap ^{MT}	+	A Verdaderos Positivos	b Falsos Positivos
	-	C Falsos Negativos	d Verdaderos Negativos

6.4 Índice de Concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino.

Este índice es una medida que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada para elementos cualitativos (Sim y Wright, 2005). Se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$k = \frac{P_o - P_c}{1 - P_c}$$

$$P_o = \frac{a-d}{n}$$

$$P_c = \frac{(f_1 * g_1) + (f_2 * g_2)}{n}$$

$$P_c = \frac{(f_1 * g_1) + (f_2 * g_2)}{n^2}$$

Dónde:

P_o = Es la proporción de acuerdos observados

P_c = Es la proporción de acuerdos esperados por casualidad

a = Verdaderos positivos

d = Verdaderos negativos

n = Total de muestras

$f_1 = a + c$

$f_2 = b + d$

$g_1 = a + b$

$g_2 = c + d$

Para interpretar el valor de κ , se dispone de una escala de medición como la siguiente:

Tabla 4. Valoración del Índice Kappa

Valor de κ	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
$0.21 - 0.40$	Débil
$0.41 - 0.60$	Moderada
$0.61 - 0.80$	Buena
$0.81 - 1.00$	Muy buena

VII. LÍMITE DE ESPACIO

El muestreo de carne fresca se llevó a cabo en el Rastro Municipal de Capulhuac, ubicado en la calle de Ignacio Allende S/N, Capulhuac de Mirafuentes CP: 52700. Capulhuac, Estado de México. Coordenadas 19°11'10.70'', Latitud Norte y 99°28'9.73'' Longitud Oeste.



Se efectuó el muestreo de carne procesada (barbacoa) en puntos de venta específicos de la ciudad de Toluca, Estado de México, los cuales fueron elegidos por el método aleatorio por conglomerados y aleatorio simple.

Los procedimientos de laboratorio se llevaron a cabo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) ubicado en Kilómetro 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México, C.P. 50200. Coordenadas 19°23'57-04'' Latitud Norte y 99°42'46.93''.

VIII. Límite de tiempo

El proyecto de investigación se realizó en un periodo de 18 meses, iniciando en el mes de Febrero de 2015, durante los cuales se realizaron las siguientes actividades:

Actividad	Total	Periodo de Tiempo
Capacitación	1	Febrero 2015
Muestreo de carne de ovino fresca	100	Marzo- Septiembre 2015
Muestreo de carne de ovino procesada	100	Octubre2015-Enero 2016
Aplicación de Encuestas	100	Octubre 2015- Diciembre 2016
Lectura de microorganismos con luminómetro para carne fresca y procesada	200	Marzo2015-Enero 2016
Cultivo bacteriano para carne fresca y procesada	200 (cultivo primario) y 200 (purificación de la muestra)	Marzo 2015- Enero 2016
Pruebas bioquímicas	200 de cada una	Marzo 2015- Febrero 2016
Entrega del Protocolo de tesis	1	Octubre 2015
Análisis de resultados	1	Marzo-Julio 2016
Redacción de Tesis	1	Agosto 2016- Enero-2018

IX. Resultados

1. Prevalencia de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovinos

El análisis de la eficiencia diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT}, para identificar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovinos, durante el proceso de la inspección higiénico-sanitaria de la carne en establecimientos de sacrificio y puntos de venta, y su comparación frente al método estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 (Estándar de Oro), arrojó los siguientes resultados (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de cepas de *E. coli* en muestras de canales calientes y carne procesada de ovino, comparando el sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar “cultivo en Placa” (NOM-092-SSA1-1994).

Tipo de muestra		Método	
		Cultivo en Placa	Sistema MicroSnap
Canales calientes	Positivas	86	38
	Negativas	13	61
	Prevalencia	86.87	38.38**
	IC _{95%}	78.23 - 92.55	29.41– 48.23
Carne procesada	Positivas	28	9
	Negativas	71	90
	Prevalencia	28.28	9.10**
	IC _{95%}	20.30-37.80	4.86-16.38

**($p < 0.05$).

En muestras de canales calientes de ovinos se estima una prevalencia de 86.86% (IC_{95%}: 78.23-92.55) la presencia de cepas de *E. coli* (86/99) por medio de la técnica de cultivo en placa; mientras que con el sistema MicroSnap^{MT}, sólo el 38.38% (IC_{95%}: 29.41-48.23), teniendo una diferencia de 48 muestras, lo que representa una amplia discrepancia entre los dos métodos ($P < 0.05$).

En muestras de carne procesada la prevalencia fue de 28.28% (IC_{95%}: 20.30-37.80) por el método estándar y del 9.10% (IC_{95%}: 4.86-16.38), la diferencia entre ambos métodos fue de fue estadísticamente diferente (P<0.05).

2. Evaluación diagnostica del sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino.

2.1 Canales calientes

La Tabla 6 muestra el resumen del análisis de la capacidad diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al método estándar (Cultivo en Placa) para identificar cepas de *E. coli* en muestras de canales calientes de ovinos. El Sistema MicroSnap^{MT} identifico el 62.63% de muestras correctamente diagnosticadas (Verdaderos Positivos+ Verdaderos Negativos/ Número de muestras) frente al método estandarizado; su sensibilidad fue de 63.95% (IC_{95%}; 52.82 – 73.83) y la especificidad de 53.85 (IC_{95%}; 26.12 – 79.88). Por cada muestra detectada con cepas de *E. coli* por el sistema MicroSnap^{MT} se detecta 1.39 muestras por el método estándar. La prevalencia de muestras positivas a cepas de *E. coli* por el sistema MicroSnap^{MT} fue del 38.4% (38/99), sin embargo, el 18.4% (7/38) de estas muestras fueron falsos positivos (FP). La mejor bondad que mostro el sistema MicroSnap fue para estimar el valor predictivo de los positivos (90.16%).

Tabla 6. Evaluación de la capacidad diagnostica del Sistema MicroSnap^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de *E. Coli* en Canales calientes de ovinos.

		Cultivo en placa		
		Criterio de referencia		
Sistema MicroSnap ^{MT}	Positivo	Positivo	Negativo	Total
	Negativo	31	7	38
	Total	55	6	61
		86	13	99

Parámetros	Valor Puntual	95% I.C.	
		LI	LS
Prevalencia de muestras contaminadas con <i>E. coli</i> (%)	86.87	78.23	92.55
Muestras correctamente diagnosticadas (%)	62.63	52.28	71.98
Sensibilidad (%)	63.95	52.82	73.83
Especificidad (%)	53.85	26.12	79.60
Valor predictivo positivo (%)	90.16	79.15	95.94
Valor predictivo negativo (%)	18.42	8.32	34.89
Cociente de probabilidades positivo	1.39	0.75	2.55
Cociente de probabilidades negativo	0.67	0.38	1.19

2.2. Carne procesada

En la tabla 7 se muestra el resumen del análisis de la capacidad diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al método estándar para identificar cepas de *E. coli* en muestras de carne procesada (Barbacoa). El Sistema MicoSnap^{MT} identifico el 72.73% de muestras correctamente diagnosticadas (VP+VN/N) frente al método estandarizado; sin embargo, la sensibilidad fue de 17.86% (IC_{95%}; 6.77 – 37.58), pero la especificidad de 94.37% (IC_{95%}; 85.46 – 98.18). En las muestras de carne procesada, por cada muestra positiva a cepas de *E. coli* el identificada por el sistema MicroSnap^{MT} había 3.17 que se detectaron por el método estándar.

La prevalencia de muestras positivas a cepas de *E. coli* por el sistema MicroSnap^{MT} fue del 9.0% (9/99), sin embargo, el 44.4% (4/9) de estas muestras fueron falsos positivos (FP). La mejor bondad fue para detectar a los verdaderos negativos (Es=94.37).

Tabla 7. Evaluación de la capacidad diagnostica del Sistema MicroSnap^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de *E. Coli* en carne procesada de ovino.

Cultivo en Placa			
Criterio de referencia			
	Positivo	Negativo	Total

Sistema MicroSnap ^{MT}	Positivo	5	4	9
	Negativo	23	67	90
	Total	28	71	99

Parámetros	Valor Puntual	95% I.C.	
		LI	LS
Prevalencia de muestras contaminadas con <i>E. coli</i> (%)	28.28	19.91	38.37
Muestras correctamente diagnosticadas (%)	72.73	62.70	80.97
Sensibilidad (%)	17.86	6.77	37.58
Especificidad (%)	94.37	85.46	98.18
Valor predictivo positivo (%)	55.56	22.65	84.66
Valor predictivo negativo (%)	74.44	63.97	82.80
Cociente de probabilidades positivo	3.17	0.92	10.95
Cociente de probabilidades negativo	0.87	0.73	1.04

3. Rendimiento global del Sistema MicroSnap^{MT} para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino (Curva Roc)

En la tabla 8 y figura 4, se muestra el análisis global (Curva ROC) para estimar el punto de corte del área bajo la curva entre la Sensibilidad y la Especificidad para el sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar.

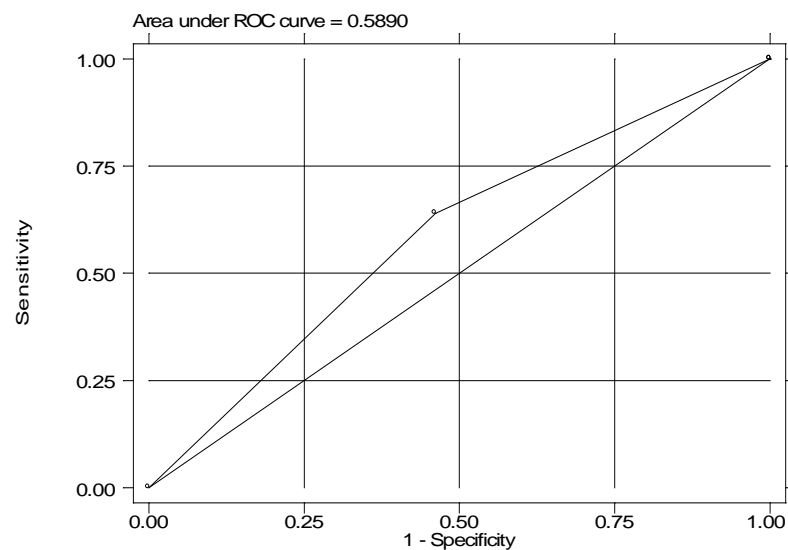
La Tabla 8, muestra el análisis global entre la sensibilidad y especificidad para el Sistema MicroSnap^{MT} frente al método estándar para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino. Como se observa, el punto de corte para el área bajo la curva del sistema MicroSnapTM en muestras de canales calientes fue de 0.589 (IC_{95%} 0.44 – 0.74) y para las muestras de carne procesada el área bajo la curva fue de 0.561 (IC_{95%} 0.48 – 0.64). En ambos casos la eficiencia global del sistema MicroSnap^{MT} según la estimación del punto de corte de la curva Roc es malo, puesto que en ambos casos el límite inferior del IC se encuentra por debajo del 0.5 de la línea diagonal de referencia, según coordenadas que van desde 0, 0 para la Sensibilidad (eje Y, ordenadas) y de 1, 1 (eje X, abscisas) para la proporción de falsos positivos (Figura 4 a, b, y c).

Tabla 8. Punto de Corte (Área bajo la curva e IC95%) entre la Se y la Es para el sistema MicroSnap^{MT} frente al cultivo en placa, para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino.

Parámetro	Tipo de muestra	
	Canal Caliente	Carne procesada
No. Observaciones	99	99
Se	63.95	17.86
Es	53.85	94.36
Cociente de Probabilidades de los Positivos	1.39	3.17
Cociente de Probabilidades de los Negativos	0.67	0.87
Área bajo la curva \pm (EErr)	0.589 \pm (0.0765)	0.561 \pm (0.0393)
IC95%	0.44 – 0.74	0.48 – 0.64

Fuente. Datos originales.
STATA 6.0.

A. Canal Caliente



B. Carne procesada

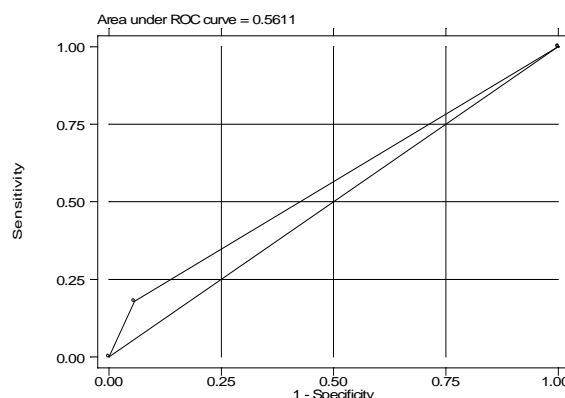


Figura 4. Punto de corte del área bajo la curva entre la sensibilidad y la especificidad del sistema MicroSnapMT para identificar cepas de *E. coli* en canales calientes de ovino y carne procesada.

Fuente: Datos originales, utilizando el Software (Stata, 6.0)

4. Índice de Concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino.

La tabla 9, muestra el Índice Kappa (IK) para el nivel de concordancia entre el Sistema MicroSnap^{MT} y el método estándar para identificar cepas de *E. coli* en canales calientes y carne procesada de ovino. El índice Kappa en las muestras de canales calientes fue de -0.069, y en las muestras de carne procesada fue de 0.15).

Tabla 9. Valor de concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap^{MT} y el Método Estándar (Cultivo en Placa) para identificar cepas de *E. coli* en muestra de canales calientes y carne procesada de ovino.

Tipo de muestra	Índice Kappa
Canales calientes	-0.0693
Carne procesada.	0.1538

Nota: El valor entre 0.8 y 1 indica una buena concordancia entre los métodos, y un valor <0.20 indica una pobre concordancia.

De acuerdo a la escala de interpretación del índice Kappa (tabla 4), podemos observar que el índice de concordancia entre ambas técnicas (MicroSnap^{MT} y

cultivo bacteriano tradicional) es pobre, lo que significa que la técnica con MicroSnap^{MT} no es confiable para detectar correctamente cepas de *E. coli*; en comparación con el método estándar de cultivo bacteriano en placa.

X. Discusión

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la capacidad diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al cultivo bacteriológico convencional como método de referencia para detectar la presencia de *E. coli* en canales frescos y carne procesada de ovino obtuvimos una baja capacidad para detectar a los verdaderos positivos (Sensibilidad=36.05, IC95%=26.17- 47.18), en canal y del 17.86%, IC95%= 6.77%- 37.58%, en barbacoa); así como una baja capacidad para detectar a los verdaderos negativos en canal (Especificidad= 46.15%, IC95%= 20.40%- 73.88%); sin embargo, mostró una alta capacidad de detección de los verdaderos negativos en la carne procesada (Especificidad= 94.37%, IC95%=85.46%- 98.18%).

La inocuidad alimentaria es tema de importancia en salud pública. El consumo de carne contaminada o de mala calidad es causa de enfermedades en poblaciones humanas expuestas (Momtaz *et al.*, 2013). En la cadena de producción, transformación y comercialización de alimentos de origen animal, cada día se presentan nuevos y novedosos procedimientos automatizados para evaluar la calidad e inocuidad de los alimentos. La industria alimentaria día a día incorpora distintas técnicas que proporcionan información complementaria de forma más rápida y más precisa. En este escenario en las dos últimas décadas del Siglo pasado y la primera del presente Siglo, aparecieron nuevos sistemas de ultrasonido junto con otras técnicas como los biosensores, sensores ópticos e infrarrojos (González Rumayor, *et al.*, 2005).

Los métodos microbiológicos estándares, para identificar y cuantificar bacterias coliformes, como el aislamiento en placa o la dilución en tubo (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos

fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. En la primera el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio que permite la recuperación de microorganismos dañados presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo, MacConkey, Verde Brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante (NOM-210-SSA1-2014).

La determinación de microorganismos coliformes fecales en muestras de alimentos se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h. La búsqueda de *Escherichia coli* se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales (Agar MacConkey, Agar eosina azul de metileno) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMVIC) a las colonias típicas.

Alrededor del 94% de las cepas de *E. coli* incluso las cepas no productoras de gas producen la enzima β -glucoronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbeliferil- β -D-glucorónido (MUG) en 4-metilumbeliferona (MU); que al ser expuesto a una fuente de luz ultravioleta (UV) de onda larga (365 nm) produce una fluorescencia azul fácil de observar. Cuando el MUG es incorporado al caldo EC se puede identificar *E. coli* (NOM-210-SSA1-2014).

Los microorganismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra. El grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este grupo está

conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. El grupo de coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h. de incubación a $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo, la más prominente es *E. coli*. La demostración y el recuento de organismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales (NOM-113-SSA1-1994).

Como se observa el método estándar de cultivo bacteriológico para *E. coli* permite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de diversos factores por lo que es importante apegarse a la técnica y controlar cuidadosamente las condiciones (Swanson, KM *et al.*, 2001; FDA, 2003).

Por su parte el sistema MicroSnap^{MT} es un método novedoso diseñado para identificar y cuantificar *E. coli* en una variedad de alimentos como carne fresca molida, pollo crudo fresco, pollo cocido, leche líquida, bacalao crudo fresco y agua embotellada. La asociación científica internacional dedicada a la excelencia analítica (AOAC) demostró que el método tiene una buena correlación con el método oficial 966.24 (AOAC, 2005) de la AOAC y con los métodos de referencia para la enumeración y detección de coliformes y *E. coli* de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA). El Método Oficial de la AOAC utiliza cepas ATCC de *E. coli*, como referencia para el control de calidad de los medios de cultivo y para el control de métodos de ensayo. Sin embargo, en el presente estudio al obtener el índice Kappa reveló que el método MicroSnap^{MT} no es tan confiable en comparación con las pruebas bacteriológicas convencionales. En canales calientes se obtuvo un índice de kappa de -0.0693 menor al encontrado en carne procesada que fue de 0.15 esto se puede relacionar a que en el proceso de elaboración de la barbacoa se alcanzan temperaturas mayores a los 60°C temperatura a la cual las *E. coli* no pueden sobrevivir según lo menciona

Michanie, 2003, cuya temperatura máxima para el crecimiento de *E. coli* es de 45°C.

Reciente, las agencias reguladoras de la inocuidad alimentaria, los laboratorios de control de calidad y los propios consumidores, podrán disponer en un futuro de dispositivos biosensores capaces de realizar análisis de manera más rápida, descentralizada y económica en muestras alimentarias complejas, tanto a pie de las unidades de producción, como en establecimientos de transformación y comercialización de alimentos.

La vigilancia epidemiológica se auxilia de herramientas específicas y sensibles para evaluar la calidad sanitaria de la carne. La microbiología de los alimentos cárnicos hace uso de diversas técnicas para identificar patógenos contaminantes; sin embargo, las técnicas de laboratorio disponibles no satisfacen las necesidades en función de costos y tiempo requerido para agilizar el proceso, así como la capacidad y eficiencia diagnóstica requerida.

El sistema MicroSnap^{MT} es un biosensor conformado por un elemento enzimático (β -galactocidasa y β -glucoronidasa) y un sustrato bioluminiscente que desarrolla un haz de luz como señal de salida, proporcional a la concentración de la enzima producida en la reacción cuando hay presencia de un microorganismo específico (Meighan, 2014). El sistema MicroSnap^{MT} promete superar la eficiencia diagnóstica de los métodos tradicionales para identificar y cuantificar microorganismos patógenos en el área agroalimentaria; sin embargo, la técnica todavía se encuentra en fase de desarrollo y ajuste.

Los trabajos reportados que usan esta metodología son escasos y relativamente recientes (Meighan, 2014). Las ventajas que ofrece esta técnica, sobre los procesos convencionales se refieren sobre todo al tiempo empleado para obtener un resultado. El proceso oscila entre 6 y 8 horas, agilizando los resultados de diagnóstico en campo. Sin embargo, tiene la desventaja de no ser una prueba con

buena sensibilidad y especificidad, principalmente al tener pocos valores predictivos de los negativos (VPN), afectándose su especificidad e incrementando la proporción de falsos positivos. No obstante este proceso técnico se encuentra en desarrollo y requiere de estudios más amplios para evaluar principalmente la fase relacionada con el periodo de incubación, ya que consideran que esta etapa es crítica para el correcto funcionamiento del sistema MicroSnap^{MT} (Meighan, 2014).

Las empresas o establecimientos que trasforman o procesan productos de origen animal para el consumo humano (Carne) se ven en la necesidad de garantizar que los productos que proveen, sean inocuos; en el mismo tenor, las instancias regulatorias oficiales deben verificar la calidad e inocuidad de los productos que se ofrecen al consumidor. En materia de análisis de alimentos de origen animal para consumo humano se realiza el análisis microbiológico que de indicios de la inocuidad del producto y de su idoneidad para ser aptos para el consumo humano. Sin embargo, muchas veces estos análisis resultan ser exorbitantes en sus costos y demorados; por lo cual se hace necesario contar con métodos o técnicas que permitan desarrollar análisis de manera rápida aumentando la productividad de los laboratorios y lo más importante que proporcione resultados confiables y seguros.

XI. Conclusiones.

1. El Sistema MicroSnap^{MT} identifico el 62.63% de muestras correctamente diagnosticadas frente al método estandarizado en las muestras de canal caliente.
2. La sensibilidad obtenida en el Sistema MicroSnap^{MT} en canales calientes fue de 63.95%
3. La especificidad obtenida en el Sistema MicroSnap^{MT} en canales calientes fue de 53.85%
4. Por cada muestra de canales calientes detectada con cepas de *E. coli* por el sistema MicroSnap^{MT} se detecta 1.39 muestras por el método estándar.
5. La mejor bondad que mostro el sistema MicroSnap^{MT} fue para estimar el valor predictivo de los positivos (90.16%).
6. El Sistema MicroSnap^{MT} identifico el 72.73% de muestras correctamente diagnosticadas frente al método estandarizado en muestras de carne procesada (barbacoa).
7. La sensibilidad obtenida en el Sistema MicroSnap^{MT} en carne procesada (barbacoa) fue de 17.86%, mientras que, la especificidad obtenida en el Sistema MicroSnap^{MT} en carne procesada (Barbacoa) fue de 94.37%
8. En las muestras de carne procesada, por cada muestra positiva a cepas de *E. coli* identificada por el sistema MicroSnap^{MT} había 3.17 que se detectaron por el método estándar.
9. La mejor bondad que mostro el sistema MicroSnap^{MT} fue para estimar el valor predictivo de los negativos (Es=94.37) en las muestras de carne procesada (barbacoa).
10. El índice de concordancia entre ambas técnicas (MicroSnap^{MT} y cultivo bacteriano tradicional) es pobre, lo que significa que la técnica con MicroSnap^{MT} no es confiable para detectar correctamente cepas de *E. coli*; en comparación con el método estándar de cultivo bacteriano en placa.

XII. LITERATURA CITADA.

Abdul Raoulf , U. M., Ammar, M. S. y Beuchat, L. R. (1996) "Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods" en *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 29, pp. 423-426.

Alocilja, E. y Radke, S., (2003) "Market analysis of biosensors for food safety" en *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 841-846.

Alonso N., L. X. y Poveda S., J. A., (2008) "Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3m™ para el análisis de alimentos" en *Javeriana* [en línea]. Bogotá, disponible en: www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf [Accesado en Enero 2018]

AOAC, (2016) "Official Methods of Analysis of AOAC International" en AOAC [en línea]. Disponible en: <http://www.ioma.aoac.org> [Accesado el 23 Febrero 2017].

Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K., Albrecht N, (2007) "Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes" en *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), pp. 4769-4775.

Bielaszewska, M., Friedrich, A. W. y Thoma, (2006) "Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome" en *Clinical infectious diseases*, 43(9), pp. 1160-1167.

Brooks, H., Mollison, B., Bettelheim, K. y Matejka, K., (2001) "Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand" en *Letters in applied microbiology*, 32(2), pp. 118-122.

Canal, A.M., Cubillos, V., Zamora, J., Reinhardt, G., Paredes, E., Ildefonso, R., y Alberdi, A. (1999) "Lesiones macro y microscópicas de intestino delgado de cerdos neonatos sin calostrear inoculados experimentalmente con cepas de *E. coli* fimbriadas" en *Archivos de medicina veterinaria*, 31 (1), pp. 69-79.

Duffy, G., Burgess, C. M. y Bolton, D. G., (2014) "A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain" en *Meat Science*, pp. 1-9.

Elder, R. O., Keen, J. E., Siragusa, G. R., Barkocy-Gallagher, G. A., Koohmaraie, M., y Laegreid, W. W., (2001) "Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing" en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), pp. 2999-3003.

Etcheverría, A. I. y Padola, N. L., (2013) "Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization" en *Virulence*, 4(5), pp. 366-372.

Evans, J., Knight, H., McKendrick, I. J., Stevenson, H., Barbudo, A. V., Gunn, G. J., y Low, J. C., (2011) "Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 and serogroups O26, O103, O111 and O145 in sheep presented for slaughter in Scotland" en *Journal of medical microbiology*, 60(5), pp. 653-660.

Farfan, M. J. y Torres, A. G., (2012) "Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains" en *Infection and immunity*, 80(3), pp. 903-913.

Favila-Humara, L. d. C., (2010) "Principales contaminantes de la carne del rastro a su consumo" en *CENID Microbiología Animal, INIFAP*, s.l.: s.n.

FDA. Food and Drug Administration, (2003). *Bacteriological Analytical Manual*. 9th ed. Arlington, VA:AOAC.

Fernández-Escudero, I., (2010) Estudio sobre el comportamiento de bacterias patógenas entéricas vehiculadas por alimentos. Tesis doctoral, México. Departamento de pediatría e inmunología, obstetricia y ginecología, nutrición y bromatología, psiquiatría e historia de la ciencia, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.

Fernández, A., García de la Fuente , C., Sáez Nieto, J. A. y Valdezate Ramos, S., (2010) "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología" en *Procedimientos en Microbiología Clínica*, pp. 1-28.

Franco, A., Lovari, S., Cordaro, G., Di Matteo, P., Sorbara, L., Iurescia, M., Donati, V., Buccella, C. y Battisti, A., (2009) "Prevalence and concentration of verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 in adult sheep at slaughter from Italy" en *Zoonoses and public health*, 56(5), pp. 215-220.

Gallegos, M., Morales, A., Álvarez, G., Vázquez, G., (2009) "Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157: H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR" en *Revista Científica*, 19(2), pp. 139-146.

González R., V., García I., E., Ruiz G., O. y Gago C., L., (2005) *Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria*, Madrid, Dirección General de Universidades e Investigación.

Gyles , C. L., (2007) "Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview" en *J. anim.sci.*, p. E45–E62.

Hajian, S., Rahimi, E. y Mommtaz, . H., (2011) "A 3-year study of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle, camel, sheep" en *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, Volume 9, pp. 162-166.

Hale, C. R., Scallan, E., Cronquist, A.B., Dunn, J., Smith, K., Robinson, T., Lathrop, S., Tobin-D'Angelo, M. y Clogher, P., (2012) "Estimates of Enteric Illness

Attributable to Contact With Animals and Their Environments in the United States" en *Clinical Infectious Diseases*, 54(5), pp. S472-S479.

Hannaoui, E. J., Villalobos, L. B. y Martínez Nazaret, R. E., (2009) "*Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento" en *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, Volume 29, pp. 13-20.

Hernandez, S., (2013). Incidencia de *Escherichia coli* O157 y *Salmonella spp.* en carne de bovino comercializada en Texcoco. Tesis de Maestría, México, Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Jacob, M. E, Foster, D. M., Rogers, A. T., Balcomb, C. C. y Sanderson, M. W., (2014). "Prevalence and Relatedness of *Escherichia coli* O157: H7 Strains in the Feces and on the Hides and Carcasses of U.S. Meat Goats at Slaughter" en *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), pp. 4154-4158.

Jiménez C. C., y León P., D. E., (2009). "Biosensores: Aplicaciones y Perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios" en *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), pp. 144-154.

Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Smith, K., O'Bryan, T. T. y Tatini, S., (2005) "Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods" en *The Journal of Infectious Diseases*, 191(7), pp. 1040-1049.

Keefe, D. T., Ryan, M., Schnadower, D. y Phillip, I. T., (2013) "Treatment of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections" en *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(3), pp. 577-597.

Khan, A., Yamasaki, S. y Sato, T., (2002) "Prevalence and Genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated

from cattle, beef and humans, Calcutta, India" en *Emerging infectious diseases*, 8(1), pp. 54-62.

López de Ullibarri , G. y Pita Fernández, S., (2001) "Medidas de concordancia: el índice de Kappa" en *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo*, pp. 169-171.

Magwedere, K., Dang, H. A., Mills, E. W., Cutter, C. N., Roberts, E. L. y DeBroy, C., (2013) "Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat" en *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, pp. 254-258.

Meighan, P., (2014) "Validation of the MicroSnap Coliform and *E. coli* Test System for Enumeration and Detection of Coliforms and *E. coli* in a Variety of Foods" en *Journal of AOAC International*, 97(2), pp. 453-476.

Michanie, S., (2003) "*Escherichia coli* O157:H7, La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne" en *Ganados y carnes*, 17(40-42).

Miko, A., Pries, K., Haby, S., Steege, K., Albrecht, N., Krause, G. y Beutin, L., (2009) "Assessment of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Wildlife Meat as Potential Pathogens for Humans" en *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), pp. 6462-6470.

Momtaz, H., Safarpour Dehkordi, F., Rahimi, E., Ezadi, H., Arab, R., (2013) "Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat" en *Meat Science*, pp. 381-388.

Momtaz, H., Farzan, R., Rahimi, E., Safarpour Dehkordi, F. y Souod, N., (2012) "Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran" en *The Scientific World Journal*, Volume 2012.

Moreno Marquez, L., (2006) Frecuencia y comportamiento de *Salmonella*, *Escherichia coli* y Organismos coliformes en el chile serrano y jalapeño. Tesis de Licenciatura, Hidalgo, México, Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.

Mosquito , S., Ruiz , J., Bauer , J. L. y Ochoa , T. J., (2011) "Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea" *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* , pp. 648-656.

Narvaez Bravo, C., Miller, M.F., Jackson, T., Jackson, S., Rodas-Gonzalez, A., Pond, K., Echeverry, A. y Brashears, M. M., (2013). "*Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in cattle and on carcasses in a vertically integrated feedlot and harvest plant in México" en *Journal of Food Protection*, pp. 786-795.

NORMA Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa

NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSa1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Ojo, O. E., Ajuwape, A. T., Otesile, E. B., Owoade, A. .A, Oyekunle, M. A. y Adetosoye, A. I., (2010) "Potentially zoonotic shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in the faeces and meat of food-producing animals in Ibadan, Nigeria" en *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), p. 214–221.

Olivet España, J. R., (2008) Determinación de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7 en leches obtenidas artesanalmente y distribuidas en 15 lecherías de la cabecera departamental de Chiquimula, Guatemala. Tesis de Licenciatura, Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Page , A. V. y Liles, C. W., (2014) "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome" en *Cloning & Transgenesis*, 3(2), pp. 681-695.

Palomino Camargo, C. y González, Y., (2014) "Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones" en *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, p. Vol. 31 (3).

Phillips, D., Jordan, D., Morris, S., Jenson, I. y Sumner, J., (2006) "Microbiological quality of Australian sheep meat in 2004" en *Meat Science*, 74(2), p. 261–266.

Piérard, D., Stevens, D., Moriau, L., Lior, H. y Lauwers, S., (1997) "Isolation and virulence factors of vero cyto toxinproducing *Escherichia coli* in human stool samples" en *Clinical Microbiology and Infection*, 3(5), p. 531–540.

Rivas, M., Leotta , G. y Chinen, I., (2008) Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Manual de procedimientos, América del Sur: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas .

Rodríguez Ángeles, G., (2002) "Principales características y diagnóstico de los grupos patogenos de *Escherichia coli*" en *Salud Pública de México*, 44(5), pp. 464-475.

Roldán, M., Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P. y Rivas, M., (2007) "Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157: H7 a partir de productos cárnicos y leche" en *Revista argentina de microbiología*, 39(2), pp. 113-119.

Rovid, A., Roth, J. A., Galyon, J., Lofstedt, J. y Lenardón, M. V., (2010) "Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales" en USA: Center for Food Security and Public Health.

SAGARPA, (2010). Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en la Producción de Carne de Bovino en Confinamiento. SAGARPA, pp. 1-54.

Samadpour, M., Stewart, J., Steingart, K., Addy, C., Louderback, J., McGinn, M., Ellington, J. y Newman, T., (2002) "Laboratory investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in Battle Ground Lake, Vancouver, Washington" en *J Environ Health*, 64(10), pp. 16-20.

Sánchez Bonastre , A., (2011) "La polymerase chain reaction (PCR)" en *Memorias IX WORKSHOP MRAMA*, pp. 10-12.

Sánchez , S., Martínez, R., García, A., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Dahbi, G., López, C., Mora, A., Rey, J. y Alonso, J. M., (2009) "Longitudinal Study of Shiga Toxin producing *Escherichia coli* Shedding in Sheep Feces Persistence of Specific Clones in Sheep Flocks" en *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), pp. 1769-1773.

Schroeder, C. M., White, D. G., Ge, B., Zhang, Y., McDermott, P. F., Ayers, S., Zhao, S. y Meng, J., (2003) "Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA" en *International Journal of Food Microbiology*, 85(2), pp. 197-202.

Sim, J. y Wright, C. C., (2005) "The Kappa Statistic in Reliability Studies: Use, Interpretation, and Sample Size Requirements" en *Physical Therapy* , p. Volume 85 . Number 3 .

Stanchi, N. O., (2010) *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires: Inter-medica.

Sunde, M., (2005) "Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin" en *Journal and Antimicrobial Chemotherapy*, pp. 1019-1024.

Swanson, K. M., Petran , R. L. y Hanlin, J. H., (2001) "Culture Methods for Enumeration of Microorganisms" en *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*, pp. 53-61.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., y Adley, C., (2010) "An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors" en *Biosensor and Bioelectronics*, pp. 232-234.

Witold, A., Ferens, J. y Hovde , C., (2011) "*Escherichia coli* O157:H7. Animal Reservoir and Sources of Human Infection" en *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(8), pp. 365-487.

Xia, X., Meng, J., McDermott, P. F., Ayers, S., Blickenstaff, K., Tran, T. T., Abbott, J., Zheng, J. y Zhao, S., (2010) "Presence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Other Potentially Diarrheagenic *E. coli* Strains in Retail Meats" en *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), pp. 1709-1717.

Zapata-García, S., Zapata-López, M. y Cartagena, C., (2014) "Cultivo y Aislamiento de bacterias" *Universidad de Antioquia*.

Zhao, S., Blickenstaff, K., Bodeis-Jones, S., Gaines, S.A., Tong, E. y McDermott, P.F., (2012) "Comparison of the prevalences and antimicrobial resistances of *Escherichia coli* isolates from different retail meats in the United States, 2002 to 2008" en *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), pp. 1701-1707.